

草鱼出血病细胞培养灭活疫苗 旋转瓶法大规模生产工艺*

曾令兵 杨先乐 贺路 艾晓辉 何介华 左文功

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州市 434000)

摘 要 Carrel氏瓶静置培养草鱼CIK细胞,细胞2~3d内长成单层,细胞单层均匀而稳定;旋转瓶培养,细胞7d左右长成单层,细胞单层面积大,病毒培养产量高。2种方式所培养病毒的TCID₅₀/ml值稳定在6.0左右。0.1%福尔马林4℃条件下灭活病毒材料17d制备疫苗,疫苗性能稳定,安全性好。疫苗效力检验结果表明,注射免疫10d和浸泡免疫10d后,免疫鱼体内血清中和抗体效价分别为 $107.9 \pm 11.0(3)$ 和 $68.5 \pm 9.9(3)$,免疫保护力分别为 $(77.1 \pm 8.9)\%(3)$ 和 $(73.9 \pm 8.3)\%(3)$,与对照组相比差异显著。本研究建立了草鱼细胞培养灭活疫苗大规模生产工艺流程,进行了较大规模的疫苗生产和生产性免疫试验,免疫草鱼成活率平均达到85%以上。

关键词 草鱼出血病,细胞疫苗,旋转瓶培养,工艺流程,生产性应用

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国主要淡水养殖鱼类之一。草鱼出血病的大范围流行造成养殖草鱼的大批死亡,严重制约了草鱼养殖的发展。张念慈、杨广智等^[1]建立了草鱼吻端组织细胞株ZC-7901,左文功等^[2]建立了草鱼肾脏组织细胞系(CIK)。杨先乐等^[3~7]利用CIK细胞研制出草鱼出血病细胞培养灭活疫苗,对疫苗制备方法、疫苗特性及草鱼免疫应答的一般规律等进行了研究,并进行了较小规模的生产性免疫试验^[8]。杨广智等¹⁾亦利用ZC-7901细胞株培养病毒研制出草鱼出血病细胞培养灭活疫苗。邓初夏等²⁾对草鱼出血病细胞培养灭活疫苗进行了初步研究和免疫效果分析。叶雪平等^[9]利用细胞生物反应器对草鱼细胞和病毒的大规模培养方式进行了研究。许淑英等^[10]对草鱼细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果进行了研究。本文对在静置和旋转条件下草鱼细胞和病毒的大规模培养技术参数、疫苗生产工艺流程及生产性免疫试验效果等进行了研究。

1 材料与方 法

收稿日期:1997-08-04

* 本文为“八五”攻关子专题“草鱼出血病细胞培养灭活疫苗大规模生产工艺研究”的部分研究内容。

1) 杨广智等. 草鱼细胞疫苗制备方法及其免疫效果初步研究. 鱼病简讯, 1986(2):9~10

2) 邓初夏等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究及其应用. 鱼病简讯, 1988(1):16~20

1.1 细胞

草鱼肾脏组织细胞系(CIK)。培养基为 0.1% CAS, 含 10% 小牛血清。

1.2 病毒

草鱼出血病病毒 854 株, 本实验室分离, 在 CIK 细胞培养物上传代培养。

1.3 细胞和病毒的大规模培养方式及增殖特性

1.3.1 细胞大规模培养 静置培养采用 Carrel 氏细胞培养瓶, 容积为 800ml, 细胞接种浓度约 $2.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 分别于培养开始后 0、6、12、18、24、44、68h 观察细胞生长情况, 记录细胞长成单层的百分数(细胞未贴壁记为 0%, 细胞长成汇合单层记为 100%), 并分别于上述相同时间每次随机取 2 瓶进行细胞计数。旋转培养采用直径 10.5cm、容积为 3 620ml 的玻璃旋转培养瓶, 2 台自制旋转培养装置, 大旋转培养装置有 184 个瓶位, 小装置有 30 个瓶位, 旋转培养瓶转速为 12r/h, 旋转培养装置置于恒温培养室内, 细胞接种浓度约 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 从细胞开始培养的 0h 起, 每间隔 24h 观察细胞生长情况, 记录细胞生长成单层的百分数, 并随机取 2 瓶进行细胞计数。

1.3.2 病毒大规模培养 静置培养和旋转培养的细胞长成汇合单层后, 按培养基使用量的 10% 接种草鱼出血病病毒 854 株细胞病毒材料, 病毒均匀吸附约 30~60min 后, 添加维持液。逐日观察病毒对细胞培养物的致细胞病变作用(CPE)。当 CPE 达到 90% 左右后收获病毒材料。采用微量细胞培养滴定系统测定病毒滴度($\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 值)。

1.4 疫苗制备与检验

疫苗制备用 0.1% 福尔马林于 4℃ 条件下灭活病毒材料 17d, 再用终浓度为 0.04% (W/V) 亚硫酸钠中和残余福尔马林。疫苗检验包括无菌检验、安全检验和效力检验等。

1.5 疫苗的大规模生产工艺和生产性免疫试验

静置培养不断提供种子细胞和病毒, 旋转培养大量制备病毒材料, 经灭活、检验后, 制备成疫苗, 实现了疫苗的大规模生产, 建立了生产工艺流程。1992 年底至 1995 年累计生产细胞疫苗 50 多万 ml, 经无菌检验、安全检验和效力检验, 符合要求。该疫苗在湖北、山东、湖南等省的近 200 个养殖场(点)进行了生产性免疫试验。

2 结果

2.1 细胞和病毒的大规模培养

静置培养和旋转培养条件下细胞生长成单层的速度和细胞增殖速度见表 1。细胞和病毒在静置培养和旋转培养条件下的技术参数见表 2。

2.2 疫苗制备与检验

所制备的疫苗 4℃ 冰箱保存。疫苗无菌检验和安全检验的结果见表 3。疫苗效力检验的结果见表 4。

2.3 疫苗大规模生产工艺和生产性免疫试验

大规模生产工艺流程见图 1。本项研究建成的疫苗生产车间可以达到年生产疫苗约 600L 的生产能力(214 个旋转瓶, 每瓶疫苗产量为 350ml, 每批次可生产疫苗 7 万多 ml, 每批生产周期为 1.5 月)。在执行过程中累计生产细胞灭活疫苗 50 多万 ml, 经检验符合要求。草鱼细胞疫苗经生产性免疫试验, 免疫草鱼的成活率平均达到 85% 以上。

表 1 静置培养和旋转培养条件下细胞长成单层的生长速度和增殖速度

Table 1 Growth speed to confluent monolayer and propagative speed of CIK cell line derived from Grass carp kidney by still and rolling culture

培养方式 Still culture	培养时间/h Culturing time	0	6	12	18	24	44	68
	单层百分数/% Cell monolayer	0	50	65	80	85	95	100
Still culture	细胞数/(10^4ml^{-1}) Cell amount	24.8	35	44.1	52.4	66	87.3	105
	培养时间/h Culturing time	0	24	48	72	96	120	144
Rolling culture	单层百分数/% Cell monolayer	0	10	25	40	60	75	90
	细胞数/(10^4ml^{-1}) Cell amount	48.0	51.8	56.6	60.7	74.3	91.2	127.5
Rolling culture	培养时间/h Culturing time	0	24	48	72	96	120	144
	单层百分数/% Cell monolayer	0	10	25	40	60	75	90
Rolling culture	细胞数/(10^4ml^{-1}) Cell amount	48.0	51.8	56.6	60.7	74.3	91.2	127.5
	培养时间/h Culturing time	0	24	48	72	96	120	144

表 2 草鱼细胞和病毒静置培养和旋转培养技术参数

Table 2 Parameters of CIK cell line and GCHV - 854 by still and rolling culture

培养方式 Culture methods		静置培养 Still culture	旋转培养 Rolling culture
培养瓶容量/ml Culture bottle and roll tube capacity		800	3620
细胞单层面积/ cm^2 Cell monolayer area		200	1350
培养条件 Culture conditions	培养基/% Medium	0.1 CAS	
	血清浓度/% Serum	10	
	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	28 $^{\circ}\text{C}$	
一次培养所需培养基量 Medium amount used for one batch culture	总量/ml Total amount	120	350
	单位面积量/($\text{ml} \cdot \text{cm}^{-2}$) Amount/ cm^2	0.60	0.26
细胞培养初始浓度/(10^4ml^{-1}) Cell culture initial concentration		20~30	50~60
细胞长成单层天数/d Days of cell growing to monolayer		2~3	7~8
病毒接种量 Virus inoculation amount	总量/ml Total amount	10	35
	单位面积量/($\text{ul} \cdot \text{cm}^{-2}$) Amount/ cm^2	50	26
病变出现时间/d Cell pathogeny emerging days post infection		About 4	About 5
病变持续时间/d Days of cell pathogeny sustained		3~4	5~6
病毒滴度/($\text{TCID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$) Titre of cultured virus		About 6.0	

表 3 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的无菌检验和安全性检查

Table 3 Bacteria-free test and safety test of cell cultured killed vaccine against the hemorrhage of Grass carp

检验项目 Tested items	方 法 Methods		结 果 Results
无菌检验 Bacteria-free test	接种普通细菌培养基 Innoculated to common bacteria culture medium		阴性 Negative
对培养细胞的安全性 Safety to CIK cell	接种于 CIK 细胞 innoculated to CIK cell	第一代 The first generation	无细胞病变 No CPE observed
		盲传第二代 The second generation by blind passage	无细胞病变 No CPE observed
		盲传第三代 The third generation by blind passage	无细胞病变 No CPE observed
		正常病毒对照 Normal virus control	出现典型细胞病变 Typical CPE observed
对鱼体的安全性 Safety to fish	腹腔注射健康草鱼 30 尾, 规格 8~10cm, 每尾 0.3~0.5ml。室温饲养 10d 后, 对鱼体进行解剖检查。 30 grass carp fingerlings(8~10cm) injected intraperitoneally, 0.3~0.5ml/ind. 10d after rearing, fish was dissected and examined		无任何异常 100% of tested fish survived and no abnormal symptom appeared
	未灭活病毒感染对照 Control group infected by unkilld cell cultured virus		出现典型出血病症状 Fish body appearing typical symptom of hemorrhage

表 4 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗效力检验

Table 4 Efficiency test of cell cultured killed vaccine against the hemorrhage of Grass carp

试验组别 Groups	免疫保护力/% Relative percent survival	血清中和抗体水平 Level of serum neutralizing antibody	与对照组比较(t 检验) Compared with control (t test)
注射免疫组 Vaccinated by injection	77.1±8.9(3)	107.9±11.0(3)*	p<0.001 Highly significant difference
浸泡免疫组 Vaccinated by immersion	73.9±8.3(3)	68.5±9.9(3)	0.001<p<0.01 Significant difference
对照试验组 Control		20.23±4.5(3)	

* 平均值±标准误差(样本数) Mean±standard deviation (sample number)

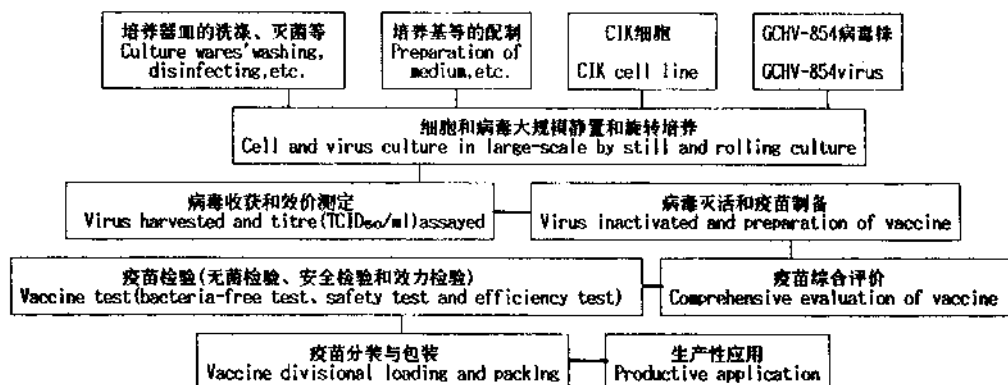


图1 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗大规模生产工艺流程图

Fig.1 Flow diagram of batch processing technology of cell cultured killed vaccine against the hemorrhage of Grass carp

3 讨论

3.1 细胞和病毒大规模培养

静置培养和旋转培养这两种培养方式具有各自的特点。旋转培养可形成的细胞单层面积大,单位面积所需培养基少,每批次所培养病毒产量高,且病毒的滴度稳定,是一种真正意义上的大规模培养方式。本研究充分利用静置培养和旋转培养各自的特点,如利用静置培养源源不断地提供种子细胞和病毒,利用旋转培养进行了大规模培养,较好地实现了疫苗的大规模生产。同时,由于使用了一种独特的廉价培养基,使得草鱼细胞疫苗的大规模生产在经济成本上亦是可行的。

3.2 疫苗制备与检验

疫苗的安全性检验结果表明,草鱼出血病细胞培养灭活疫苗对于细胞培养物和鱼体十分安全。疫苗效力检验结果表明,免疫10d后鱼体内的血清中和抗体水平达到了较高的水平,显著地高于对照组,免疫鱼已获得较强的抗病毒感染免疫力。疫苗的安全性和免疫效力检验结果也说明了本研究采用的灭活方法是适宜的。应该说明,在免疫10d后所测定的鱼体血清中和抗体水平和免疫保护力并不是鱼体免疫应答最强的时期。一般情况下,免疫反应在免疫后20~30d达到最高水平,此时鱼体血清中和抗体效价一般在200左右,免疫保护力在85%以上。

3.3 疫苗生产性免疫试验

根据对疫苗生产性应用免疫效果进行抽样调查的结果,免疫草鱼的平均成活率达到了85%以上,比没有免疫草鱼的平均成活率提高了30%左右。这说明使用草鱼出血病细胞培养灭活疫苗免疫草鱼,较好地解决了长期困扰养殖者的草鱼出血病问题。

参 考 文 献

- [1] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 的建立和生物学特性观察. 水产学报, 1981, 5(2): 111~119
- [2] 左文功等. 草鱼肾脏组织细胞系(CIK)的建立及其生物学特性观察. 水产学报, 1986, 10(1): 11~17
- [3] 杨先乐等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告. 淡水渔业, 1986, 3: 1~5
- [4] 杨先乐等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究 - 疫苗株的免疫原性及其有效免疫剂量的比较. 水产学报, 1989, 13(2): 138~144
- [5] 杨先乐等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究 - 最佳灭活方法的探讨. 中国水产科学, 1990, 3(1): 29~34
- [6] 杨先乐, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究 - 疫苗的稳定性及佐剂和加强免疫对草鱼免疫应答的影响. 水生生物学报, 1993, 17(1): 46~51
- [7] 杨先乐, 曾令兵. 草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的研究. 水产学报, 1993, 17(4): 312~318
- [8] 杨先乐等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究 - 生产性试验. 水产科技情报, 1992, 19(1): 10~14
- [9] 叶雪平等. 细胞生物反应器大规模培养草鱼细胞和病毒研究. 水产学报, 1992, 16(1): 1~5
- [10] 许淑英等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果. 水产学报, 1994, 18(2): 110~117

Batch processing technology of cell cultured killed vaccine against the hemorrhage of Grass carp

Zeng Lingbing Yang Xianle He Lu Ai Xiaohui He Jiehua Zuo Wengong

(Institute of Yangtze River Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract The large-scale culture of the CIK cell line derived from the kidney of Grass carp and the virus of hemorrhage of Grass carp were realized by using still culture in 800 ml glass Carrel's bottle and rolling culture in 3 620 ml glass rolling bottle. The virus culture titres were assayed by microtitre system and the TCID₅₀/ml value was stable at about 6.0. The vaccine was prepared by using 0.1% Formalin to inactivate virus at 4℃ for 17 days, and the bacteria-free test and the safety test to CIK cell and fish body were carried out. The vaccine immune efficiency was tested by examining the neutralizing antibody level in fish serum and the relative percent age survival. The batch processing technology of cell cultured killed vaccine against the hemorrhage of Grass carp was established, the batch processing of the vaccine was realized, and the productive application of the vaccine was conducted in relatively large-scale.

Key words Hemorrhage of Grass carp, Cell cultured killed vaccine, Rolling culture, Batch processing technology, Productive application